

А.И. ЕМЕЦ, В.В. РАДЧУК¹,
А.В. ПАХОМОВ, Я.Б. БЛЮМ

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины, Киев
E-mail: alyemets@univ.kiev.ua

¹ Институт генетики растений и исследований культурных растений,
Гатерслебен, 06466, Германия

БИОЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ СОИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО МАРКЕРНОГО ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К ДИНИТРОАНИЛИНАМ



Проведена биолистическая трансформация сои с использованием конструкции рАНТУАт, содержащей мутантный ген α -тубулина, в качестве селективного маркерного гена, обеспечивающего устойчивость к динитроанилиновым гербицидам, а также дополнительной конструкции рАНТUB1, содержащей полноразмерный ген β -тубулина ячменя, для корректной коэкспрессии экзогенного тубулина в клетках трансгенных линий сои. Определено, что 10 мкМ является наиболее оптимальной селективной концентрацией трифлуралина при отборе трансформированных линий сои. Трансгенная природа отобранных регенерантов подтверждена при помощи Саузерн-блоттинга с использованием специфической пробы к селективному гену α -тубулина.

© А.И. ЕМЕЦ, В.В. РАДЧУК, А.В. ПАХОМОВ,
Я.Б. БЛЮМ, 2008

Введение. На сегодняшний день для создания трансгенных линий растений используется более 50 маркерных генов, перспективы коммерческого применения каждого из которых всесторонне изучаются с точки зрения их эффективности, дешевизны и безопасности [1]. Используемые селективные маркерные гены объединяют в несколько групп в зависимости от того, обеспечивает ли их использование позитивную (выживание трансформированных клеток) или негативную (гибель трансформированных клеток) селекцию, а также является ли селекция зависимой от присутствия дополнительных субстратов. Именно простота и удобство применения определили наиболее широкое распространение позитивных маркерных генов, позволяющих осуществить селекцию с использованием таких агентов, как антибиотики, гербициды и другие биологически активные вещества.

Эффективными маркерными генами часто оказываются репортерные гены, позволяющие отбирать трансформированные клетки визуально. Разработаны пути селекции, предполагающие удаление маркерных генов с помощью индуцибельных промоторов, которые обеспечивают вырезание предусмотренных последовательностей [2]. Все шире применяются позитивные селективные маркерные гены, экспрессия которых влияет на физиологические процессы, управляющие развитием растения [3, 4].

Однако, несмотря на такое большое количество предложенных маркерных генов, в генетической инженерии растений используются всего лишь несколько из них. Этот выбор определяется многими факторами, в число которых входит дешевизна и простота использования селективных генов в проводимых исследованиях, а также необходимость исключения их побочных эффектов. Хотя до сих пор не показано никаких негативных эффектов от используемых маркерных генов устойчивости к антибиотикам с точки зрения биобезопасности, существующие опасения в обществе уже определили их полный запрет в странах ЕС с 1-го января 2009 г. (Директива ЕС 2001.18.ЕС).

Испытание и внедрение новых маркерных генов, несущих генетическую информацию исключительно растительного происхождения, составляет потенциально значимый практический интерес для решения насущных

проблем генетической инженерии растений. Подобная задача может быть решена за счет использования в качестве маркерного гена какого-либо из генов конститутивных белков клетки, способного подвергаться регуляции со стороны соответствующего селективного агента. Этим условиям соответствует тубулин, формирующий микротрубочки как неотъемлемый структурный компонент цитоскелета любой эукариотической клетки [5]. Именно обнаружение природных биотипов растений с мутантным тубулином, обладающим устойчивостью к антимикротрубочковым гербицидам, а также селекция аналогичных мутантов *in vitro* [5, 6] открыли возможность использования аналогичного подхода в генетической инженерии растений.

Одна из таких попыток, направленная на использование мутантных генов тубулина в качестве селективных маркеров в генетической инженерии растений, была предпринята группой исследователей, которые разработали стратегию применения в качестве маркерного признака устойчивость тубулина к фенилкарбамам, в частности, к этил-*N*-фенилкарбамату, ЭФК [7]. Эта разработка предполагала использование микротрубочковых мутантов риса, устойчивых к ЭФК [8], где в качестве источника селективного гена планировалось взять мутантный ген α -тубулина, который способен кодировать молекулу этого белка, лишённую С-концевой части [9]. Однако в силу недостаточных доказательств существования такого механизма устойчивости к ЭФК и связанных с этим технологических сложностей в осуществлении практической разработки этот подход не получил должного развития.

Параллельно нами был описан подход для использования мутантного гена тубулина, определяющего устойчивость к динитроанилинам (в частности, к трифлуралину, пендиметалину и оризалину), а также к фосфоротиоамидатам (таким как амипрофосметил, АПМ), в качестве нового маркерного гена для селекции трансгенных растений [10, 11]. Необходимо отметить, что эти соединения характеризуются очень высоким сродством к растительным тубулинам по сравнению с тубулинами животных, которые проявляют к ним крайне низкую чувствительность [12]. Разработанный подход был успеш-

но апробирован при получении трансгенных растений льна, в результате чего мутантный ген α -тубулина был использован не только в качестве маркерной селективной системы, но и обеспечил высокую степень резистентности трансгенных растений к динитроанилинам [11].

В связи с растущим интересом к широкомасштабному культивированию трансгенных сортов сои в разных странах мира, начало которому было положено успешным введением на рынок биотехнологической компанией «Монсанто» (США) в 1996 г. генетически модифицированной сои, устойчивой к гербициду глифосату [13], значительную актуальность приобретает возможность использования современных биотехнологических подходов для улучшения хозяйственно ценных характеристик сортов сои как зарубежной, так и отечественной селекции [14, 15]. Поскольку для трансформации сои геном устойчивости к глифосату («Раундап») — енолпируватшики-матфосфатсинтетазы из почвенной бактерии *Agrobacterium* — были применены простые и ставшие уже классическими подходы для селекции трансгенных растений *in vitro*, попытки создания и усовершенствования генных маркерных систем для получения трансгенных линий сои интенсивно развиваются [4, 16–18].

Это связано с тем, что в случае трансформации сои невозможно использовать для селекции трансгенных линий ген фосфоманнозоизомеразы *pmi* из *Escherichia coli*, который получил недавно распространение как практически идеальный альтернативный селективный маркер для трансформации как однодольных, так и двудольных растений, в том числе льна [19], риса [20], пшеницы и кукурузы [21]. Как известно, манноза является токсичной для растительных клеток, ибо способна конвертироваться в них до маннозо-6-фосфата — ингибитора гликолиза, а многие растения не содержат фосфоманнозоизомеразы, которая превращает маннозо-6-фосфат в фруктозо-6-фосфат (интермедиатный продукт гликолиза). Однако бобовые, и во том числе соя, обладают фосфоманнозоизомеразной активностью, поэтому данный селективный ген для этих растений неприменим [22].

Несмотря на успех применения генетически модифицированной сои с устойчивостью к

глифосату, существуют несколько других классов гербицидов, широко используемых в сельском хозяйстве, к которым соя чувствительна. Одним из таких классов гербицидов, нарушающих митоз, являются динитроанилины. К ним относятся такие известные соединения, как трифлуралин (трефлан, нитран), которым в больших масштабах обрабатывают хлопчатник, сою, подсолнух, капусту, томаты и другие культуры, а также его аналоги — пендаметалин (стомп, проул), нитралин и оризалин [23, 24]. Использование генов устойчивости к таким гербицидам может дать возможность не только внедрения новых селективных маркерных систем, но и привести в случае их успешного применения к оптимизации условий выращивания и удешевлению производства сои.

Целью настоящей работы было создание векторных конструкций, содержащих мутантный ген α -тубулина *TuAm1* из природного динитроанилин-устойчивого биотипа растения *Eleusine indica*, и изучение возможности использования этого гена в качестве маркерного для селекции трансгенных растений сои после биолистической трансформации.

Материалы и методы. Конструкции для трансформации. Для биолистической трансформации растений были созданы две конструкции — рАНТУAm и рАНТUB1 (рис. 1). Конструкция рАНТУAm содержала кДНК мутантного гена α -тубулина (*TUAm1*) гусиной травы [25] под контролем убихитинового промотора кукурузы и терминатора нопалинсинтазы (NOS). Для создания конструкции ген *TUAm1* был вырезан с помощью частичного переваривания с использованием эндонуклеаз *EcoRI* и *SacI* и в дальнейшем клонирован в те же рестрикционные сайты между промотором и терминатором в векторе рАНС25 [26]. Для создания конструкции рАНТUB1 ген β -тубулина 1 (*HvTUB1*) из ячменя [27] был амплифицирован с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров 5'-TCG-CCCCGGGATGAGGGAGATCCTGCAC-3' (подчеркнут встроенный сайт рестрикции для эндонуклеазы *SmaI*) и 5'-CACACAGACCTCC-GAGCTCTTACATG-3' (подчеркнут сайт рестрикции для *SacI*) и клонирован в вектор рАНС25 между убихитиновым промотором

и pos-терминатором по рестрикционным сайтам *SmaI/SacI*. Обе конструкции дополнительно содержали ген *bar* также под убихитиновым промотором и pos-терминатором. Правильность клонирования была проверена с помощью рестрикционного анализа и сиквенированием. Обе конструкции были использованы для котрансформации эксплантов сои в одинаковой концентрации, поскольку, как было показано ранее [28], только трансгенные растения, экспрессирующие обе субъединицы экзогенного тубулина, могут быть жизнеспособными.

Растительный материал. В качестве растительного материала использовали каллус высокоэмбриогенного сорта сои Киевская-91, который индуцировали из незрелых зародышей и выращивали на соответствующих средах [14].

Определение селективной концентрации трифлуралина. Был проведен анализ чувствительности клеток каллуса сои к действию трифлуралина («DowElanco», США) с целью определения селективной концентрации вещества. Концентрацию трифлуралина определяли, как описано ранее [29, 30]. Тестирование каллуса на выживаемость проводили в диапазоне концентраций трифлуралина от 0,1 до 50 мкМ. Для этого трифлуралин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляли его в соответствующих концентрациях в охлажденную стерильную питательную среду для каллусообразования сои.

Генетическая трансформация сои. Биолистическую трансформацию каллуса осуществляли согласно методу [31] с некоторыми модификациями. По 2 мкг ДНК конструкций рАНТУAm и рАНТUB1 добавляли к смеси, содержащей 25 мкл 2,5 М CaCl_2 и 10 мкл 0,1 М спермидина, затем осаждали на вольфрамовых микрокапсулах, которые промывали в этаноле и подсушивали на фильтре на протяжении 10 мин. Каллусные экспланты размером 2–3 см размещали по центру чашки Петри, содержащей осмотическую среду [31], на 4 ч до и на 16 ч после бомбардирования. Биолистическую трансформацию каллуса сои осуществляли с использованием следующих параметров: давление гелия — 0,7 МПа, уровень вакуума — 0,9 бар, дистанция полета микрокапсул — 7 см. Для эксперимента было взято 100 каллусных

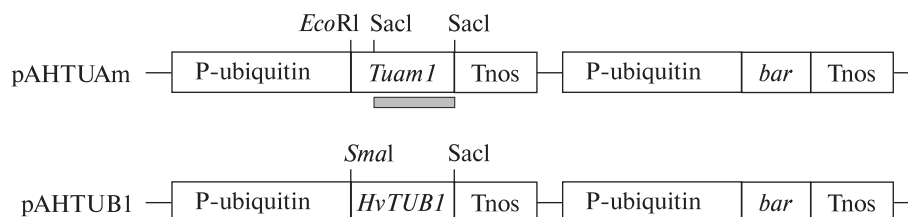


Рис. 1. Схема конструкций pANTUAm (вверху) и pANTUB1 (внизу). P-ubiquitin – убихитиновый промотор кукурузы, *Tuam1* – ген мутантного α -тубулина, Tnos – терминатор нопалинсинтетазы, *HvTUB1* – ген β -тубулина ячменя, *bar* – ген устойчивости к глифосату. Указаны также сайты клонирования для *TUAm1* и *HvTUB1* генов. Серым блоком внизу схематически отмечен фрагмент последовательности гена *TUAm1*, который использовался для блоттинг-гибридизации по Саузерну

эксплантов. Спустя неделю после бомбардирования экспланты переносили на соответствующую питательную среду [14], которая содержала селективную концентрацию трифлуралина, для селекции трансгенных линий сои.

Молекулярно-генетический анализ трансформантов. Для блоттинг-гибридизации по Саузерну тотальную ДНК выделяли из молодых побегов регенерантов сои с помощью DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», Германия). Затем 5 мкг растительной ДНК трансформированных и контрольных линий обрабатывали эндонуклеазой *HindIII* («Roche Diagnostics», Германия) в течение ночи при 37 °С. Рестрикционные фрагменты ДНК разделяли в 1%-ном агарозном геле и переносили на нейлоновый фильтр Hybond-NX («Amersham», США) согласно стандартной процедуре [32]. Последующие гибридизацию, отмывку и экспозицию проводили, как описано ранее [33]. В качестве пробы использовали *SacI*-фрагмент гена α -тубулина (*TUAm1*) из вектора pANTUAm (рис. 1), который метили ^{32}P -dCTP с использованием Rediprime II kit («Amersham», Великобритания).

Результаты исследований и их обсуждение. В качестве эксплантов для биолиственной трансформации был использован высокоэмбриогенный каллус сои, индуцированный из незрелых зародышей семян. Такой подход базировался на ранее установленном и подтвержденном факте, показывающем, что успех генетической трансформации в значительной степени зависит от ряда параметров, к числу которых относятся правильный выбор эксплантов и хорошо разработанный метод регенерации из них растений [14, 15]. Поскольку различного рода манипуляции с асептическими клетками и тканями

сое являются трудоемкими и нередко безрезультатными, ранее нами были введены в культуру *in vitro* сорта сои, районированные в зоне украинских Лесостепи и Полесья, а также проведена оценка их эмбриогенного потенциала [14] с целью отбора наиболее перспективных генотипов для последующей генетической трансформации. У сортов Чернытка, Киевская-27, Киевская-91, Васильковская, Марьяна, Чернобурая и Альгаир была проанализирована способность к каллусообразованию и регенерации растений. Установлено, что наиболее эффективная регенерация побегов из эмбриогенного каллуса, полученного из незрелых семян сои, наблюдалась у сортов Киевская-91, Марьяна и Васильковская [14]. Среди этих трех генотипов был выделен и рекомендован для использования в опытах по биолиственной трансформации сорт Киевская-91, поскольку для него были отмечены самые высокие показатели регенерации растений [14].

Поскольку предполагалось использовать мутантный ген тубулина *TUAm1* в качестве селективного маркерного гена, встроенного в созданную нами конструкцию pANTUAm (рис. 1, вверху), был проведен анализ выживаемости клеток каллуса сорта Киевская-91 в присутствии различных концентраций трифлуралина для установления его эффективной концентрации как селективного агента. Обнаружено, что эффективной концентрацией трифлуралина, приводившей к гибели более 50 % клеток каллуса сои и полностью угнетавшей его регенерационную способность, была концентрация 10 мкМ. Именно эта концентрация была использована для селекции трансгенных линий сои после проведе-

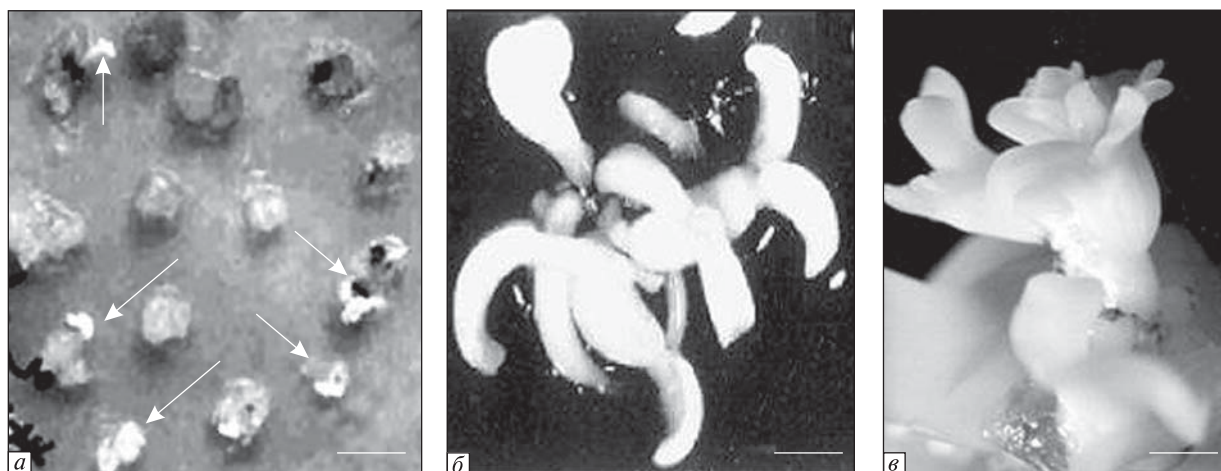


Рис. 2. Селекция выживших калусных тканей (указано стрелками) на среде, содержащей 10 мкМ трифлуралин (а) и регенерирующие побеги сои линий S1 и S6 соответственно (б, в) в присутствии 10 мкМ трифлуралина. Масштаб: в 1 см — 0,9 мм (А), 0,35 мм (Б) и 0,2 мм (В)

ния биолистической трансформации каллуса. Эти данные согласуются с полученными ранее результатами по установлению селективной концентрации трифлуралина для отбора трансгенных линий льна-долгунца после агробактериальной трансформации с использованием того же мутантного гена тубулина [11].

Для успешной интеграции в геном *G. max* мутантного гена α -тубулина в процессе бомбардирования и его экспрессии в реципиентных клетках нами был дополнительно осуществлен перенос гена β -субъединицы тубулина, изолированного из *Hordeum vulgare*, который находился в векторе рАНТUB1 (рис. 1). Ранее было установлено, что наличие именно обеих субъединиц (α и β) экзогенного тубулина является предпосылкой его успешной коэкспрессии [11, 28] и дальнейшей их кополимеризации в структуры микротрубочек трансформированных клеточных линий [28].

После бомбардирования микрочастицами экспланты сои выдерживали в течение недели на питательной среде для каллусогенеза без добавления селективного агента. Затем для регенерации побегов их переносили на соответствующую питательную среду, которая содержала 10 мкМ трифлуралина для селекции гербицид-устойчивых линий [14]. Селективное давление в культуре осуществляли на протяжении 3–4 месяцев. Линии, которые были способны выживать в присутствии трифлуралина

Линии S1 S2 S3 S4 S5 S6 SK

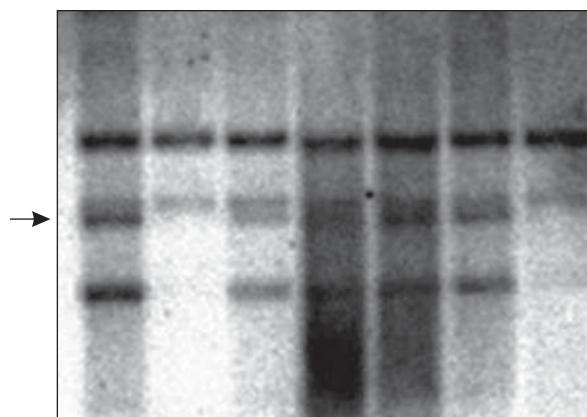


Рис. 3. Анализ трансгенных растений сои методом гибридизации по Саузерну. Трансгенные линии сои (S1–S6) имеют одну дополнительную полосу (за исключением линии S2), характерную для α -тубулина (стрелка), по сравнению с контролем (SK). Размер полосы соответствует интегрированному мутантному гену альфа-тубулина (*TUAm1*) *E. indica*, обеспечивающему устойчивость к динитроанилиновому гербициду трифлуралину

лины (рис. 2, а), переносили для дальнейшего культивирования и размножения. В результате селекции нами отобраны шесть линий сои (S1–S6), способные к формированию эмбриогенных структур и регенерирующих побегов в присутствии трифлуралина (рис. 2, б, в).

Для установления наличия перенесенного гена α -тубулина был проведен молекулярно-

биологический анализ шести регенерированных растений сои с использованием метода гибридизации по Саузерну. Геномные последовательности α -тубулина растений очень консервативны [34], поэтому в результате анализа по Саузерну наблюдали наличие трех гибридизационных фрагментов как в регенерированных, так и в контрольном растении (рис. 3). Однако геном пяти регенерированных линий характеризовался наличием дополнительной гибридизационной полосы, которая по своей длине соответствовала длине полосы, рассчитанной для перенесенного мутантного гена *TUAm1*. Только линия S2 не показала дополнительного гибридизационного сигнала (рис. 3). Именно эта линия не была способна к побегообразованию при дальнейшем культивировании в условиях *in vitro*. Исходя из полученных данных молекулярно-биологического анализа можно заключить, что частота трансформации эмбрионного каллуса для сорта Киевская-91 находилась в пределах 5–6 %.

Необходимо отметить, что более высокие показатели эффективности трансформации сои достигнуты рядом авторов при усовершенствовании агробактериального метода переноса желательных генов. Так, например, в некоторых работах показано, что при оптимизации этого метода можно добиться увеличения показателя частоты трансформации до 8,7 % [35], 11,7 % [36], 15,8 % [37] и 16,4 % [38], хотя очень часто этот показатель для сои может находиться в пределах 0,7 % [38] – 3,8 % [35, 36].

Недавно было продемонстрировано, что при использовании биолистической трансформации с использованием в качестве селективного маркерного гена мутантного гена ацетоллактазсинтетазы, обеспечивающего устойчивость к гербициду имзапапуру [39], частота трансформации сои может достигать 9 % [40]. Учитывая, что полученные данные по частоте трансформации сои являются сопоставимыми с результатами других авторов, можно заключить, что разработанный метод селекции трансгенных линий растений с помощью предложенного нами селективного агента трифлюралина может быть применен для ряда других видов растений.

Более того, селекция на трифлюралине уже была успешно осуществлена нами при получении межвидовых и межтрибных соматических гибридов, где в качестве доноров использовали трифлюралин-устойчивые мутанты [41, 42]. В этих работах установлено, что селекция на трифлюралине обеспечивала интеграцию мутантного тубулина из клеток-доноров и их последующую стабильную экспрессию в клетках реципиентных видов [41, 42]. Совсем недавно система для агробактериальной трансформации растений на основе мутантного гена α -тубулина из гусиной травы и β -тубулина из ячменя была применена нами для трансформации льна-долгунца. У трансгенных линий, отобранных на среде, содержащей трифлюралин, привнесенный мутантный тубулин не только стабильно экспрессировался [11], но и интегрировался в микротрубочки клеток трансформантов, обеспечивая их устойчивость к деполимеризации под действием упомянутого соединения.

Таким образом, в работе впервые описаны результаты по осуществлению успешного переноса мутантного гена тубулина, который обеспечивает устойчивость к динитроанилиновым гербицидам, в растения сои с помощью биолистической трансформации с использованием разработанной новой селективной маркерной системы. Продемонстрирована возможность селекции трансгенных линий сои на одном из самых эффективных динитроанилиновых гербицидов – трифлюралине. Успешная интеграция и экспрессия безопасного маркерного гена природного происхождения в отобранных в результате селекции линиях подтверждена с помощью блоттинг-гибридизации по Саузерну. Предложено использовать новый маркерный ген для генетической трансформации других важных видов высших растений.

A.I. Yemets, V.V. Radchuk,
A.V. Pakhomov, Ya.B. Blume

BIOLECTIC TRANSFORMATION OF SOYBEAN
BY NEW SELECTIVE
MARKER GENE CONFERRING RESISTANCE
TO DINITROANILINES

Biolistic transformation of soybean by construction carrying a mutant α -tubulin gene as selective marker gene conferring resistance to dinitroaniline herbicides, and by additional construction pAHTUB1 carrying a full-length

barley β -tubulin gene for correct co-expression of exogenous tubulin in cells of transgenic soybean lines has been realized. It was established that 10 μ M trifluralin is the most optimal selective concentration to pick up transformed soybean lines. Transgenic nature of obtained regenerants was confirmed by Southern blotting hybridization using specific probe to selective α -tubulin gene.

A.I. Ємець, В.В. Радчук, А.В. Пахомов, Я.Б. Блюм

**БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ СОЇ
З ВИКОРИСТАННЯМ НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО
МАРКЕРНОГО ГЕНА СТІЙКОСТІ
ДО ДІНІТРОАНИЛІНІВ**

Здійснено біолистичну трансформацію сої з використанням конструкції pANTUAm, що містила мутантний ген α -тубуліну, як селективний маркерний ген, що забезпечує стійкість до динітроанілінових гербіцидів, а також додаткової конструкції pANTUB1, яка містила повнорозмірний ген β -тубуліну ячменя, для коректної коекспресії екзогенного тубуліну в клітинах трансгенних ліній сої. Встановлено, що 10 мкМ трифлуралін є найоптимальнішою селективною концентрацією при відборі трансформованих ліній сої. Трансгенну природу відібраних регенерантів підтверджено за допомогою Саузерн-блотингу з використанням специфічної проби до селективного гена α -тубуліну.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Miki B., McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety // *J. Biotechnol.* – 2004. – **107**. – P. 193–232.
2. Zuo J., Niu Q.W., Moller S.G., Chua N.H. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants // *Nature Biotechnol.* – 2001. – **19**. – P. 157–161.
3. Richael C.M., Kalyaeva M., Chretien R.C., Yan H., Adimulam S., Stivison A., Weeks J.T., Rommens C.M. Cytokinin vectors mediate marker-free and backbone-free plant transformation // *Transgenic Res.* – 2008. – **17**, № 5. – P. 905–917.
4. Ye X., Williams E.J., Shen J., Esser J.A., Nichols A.M., Petersen M.W., Gilbertson L.A. Plant development inhibitory genes in binary vector backbone improve quality event efficiency in soybean transformation // *Transgenic Res.* – 2008. – **17**, № 5. – P. 827–838.
5. Емець А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // *Физиол. растений.* – 1999. – **46**, № 6. – С. 899–907.
6. Baird V., Blume Ya.B., Wick S.M. Microtubular and cytoskeletal mutants // *Plant microtubules-potential targets for biotechnological applications* / Ed. P. Nick – Frankfurt; Berlin : Springer Verlag, 2000. – P. 155–187.
7. Nick P., Christou P., Breviario D. Generating transgenic plants by minimal addition of exogenous DNA – a novel selection marker based on plant tubulins // *AgBiotechNet.* – 2003. – **5**. – ABN 105.
8. Nick P., Yatou O., Furuya M., Lambert A.-M. Auxin-dependent microtubule responses and seedling development are affected in a rice mutant resistant to EPC // *Plant J.* – 1994. – **6**. – P. 651–663.
9. Wiesler B., Wang Q.-Y., Nick P. The stability of cortical microtubules depends on their orientation // *Plant J.* – 2002. – **32**. – P. 1023–1032.
10. Емець А.И., Блюм Я.Б. Мутантные гены тубулинов растений как маркерные селективные гены для генетической инженерии // *Цитология и генетика.* – 2007. – **41**, № 3. – С. 29–43.
11. Емець А.И., Баер О.А., Радчук В.В., Блюм Я.Б. Агробактериальная трансформация льна-долгунца мутантным геном тубулина, несущим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам // *Генетика.* – 2009. – № 2 (принята к опубликованию).
12. Blume Ya.B., Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Baird W.V. Structural modeling of plant α -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoroamidates // *Cell Biol. Int.* – 2003. – **27**. – P. 171–174.
13. Dill G.M., Cajacob C.A., Padgett S.R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations // *Pest. Manag. Sci.* – 2008. – **64**, № 4. – P. 326–331.
14. Пахомов А.В., Емець А.И., Ху Ч.-Е., Блюм Я.Б. Оценка эмбрионного потенциала сортов сои, районированных в зоне украинских Лесостепи и Полесья, как необходимый этап для их дальнейшей трансформации // *Цитология и генетика.* – 2004. – **38**, № 1. – С. 49–54.
15. Пахомов А.В., Емець А.И., Блюм Я.Б. Сравнительный анализ эмбрионного потенциала сортов сои, районированных в различных эколого-географических зонах мира // *Цитология и генетика.* – 2005. – **39**, № 5. – С. 20–27.
16. Inaba Y., Brotherton J.E., Ulanov A., Widholm J.M. Expression of a feedback insensitive anthranilate synthase gene from tobacco increases free tryptophan in soybean plants // *Plant Cell Rep.* – 2007. – **26**, № 10. – P. 1763–1771.
17. Inaba Y., Zhong W.Q., Zhang X.H., Widholm J.M. Specificity of expression of the GUS reporter gene (uidA) driven by the tobacco ASA2 promoter in soybean plants and tissue cultures // *J. Plant Physiol.* – 2007. – **164**, № 7. – P. 824–834.
18. Nishizawa K., Kita Y., Kitayama M., Ishimoto M. A red fluorescent protein, DsRed2, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean // *Plant Cell Rep.* – 2006. – **25**, № 12. – P. 1355–1361.
19. Lamblin F., Aimé A., Hano C., Roussy I., Domon J.M.,

- Van Droogenbroeck B., Lainé E.* The use of the phosphomannose isomerase gene as alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of flax (*Linum usitatissimum*) // *Plant Cell Rep.* – 2007. – **26**, № 6. – P. 765–772.
20. *Lucca P., Ye X., Potrykus I.* Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent // *Mol. Breed.* – 2001. – **7**. – P. 43–49.
21. *Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Reed J., Kramer C., Chang Y., Novitzky R., Wang H., Artim-Moore L.* Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as selectable marker // *Plant Cell Rep.* – 2001. – **20**. – P. 429–436.
22. *Chiang Y.C., Kiang Y.T.* Genetic analysis of mannose-6-phosphate isomerase in soybeans // *Genome.* – 1988. – **30**. – P. 808–811.
23. Мельников Н.Н. Пестициды: химия, технология, применение. – М.: Химия, 1987. – 711 с.
24. Брицун В.М., Ємець А.І., Лозинський М.О., Блюм Я.Б. 2,6-Динітроаніліни: синтез, пестицидні та антипротозойні властивості // *Ukr. Biorganica Acta.* – 2008. – **6**, № 2. – P. 43–56.
25. *Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V.* α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // *Plant Cell.* – 1998. – **10**. – P. 297–308.
26. *Christensen A.H., Quail P.H.* Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants // *Transgenic Res.* – 1996. – **5**. – P. 213–218.
27. *Radchuk V.V., Sreenivasulu N., Blume Y., Weschke W.* Distinct tubulin genes are differentially expressed during barley grain development // *Physiol. Plant.* – 2007. – **131**. – P. 571–580.
28. *Anthony R., Waldin T., Ray J., Bright S., Hussey P.* Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // *Nature.* – 1998. – **393**. – P. 260–263.
29. *Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P. et al.* Transfer of amiprophosmethyl-resistance from a *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridization // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – **100**. – P. 847–857.
30. *Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B.* Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) // *Plant Cell Rep.* – 2003. – **21**. – P. 503–510.
31. *Abumhadi N., Trifonova A., Takumi S., Nakamura C., Todorovska E., Getov L., Christov N., Atanassov A.* Development of the particle inflow gun and optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation in mature embryos of cereals // *Biotech. Equip.* – 2001. – **15**, № 2. – P. 87–96.
32. *Sambrook J., Russell D.W.* Molecular cloning: A laboratory manual / Cold Spring Harbour Press: Cold Spring Harbour, NY. – 2001. – 999 p.
33. *Radchuk V.V., Sreenivasulu N., Blume Y., Weschke W.* Distinct tubulin genes are differentially expressed during barley grain development // *Physiol. Plant.* – 2007. – **131**. – P. 571–580.
34. *Radchuk V.V.* The transcriptome of tubulin genes in plants // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology* / Eds Ya. Blume, W. Baird, A. Yemets and D. Breviaro). – Berlin etc. : Springer-Verlag, 2008. – P. 231–253.
35. *Paz M.M., Martinez J.C., Kalvig A.B., Fonger T.M., Wang K.* Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation // *Plant Cell Rep.* – 2006. – **25**, № 3. – P. 206–213.
36. *Liu S.J., Wei Z.M., Huang J.Q.* The effect of cocultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties // *Plant Cell Rep.* – 2008. – **27**, № 3. – P. 489–498.
37. *Liu H.K., Yang C., Wei Z.M.* Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system // *Planta.* – 2004. – **219**, № 6. – P. 1042–1049.
38. *Olhoft P.M., Flagel L.E., Donovan C.M., Somers D.A.* Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method // *Planta.* – 2003. – **216**, № 5. – P. 723–735.
39. *Sathasivan K., Haughn G.W., Murai N.* Nucleotide sequence of a mutant acetolactate synthase gene from an imidazolinone resistant *Arabidopsis thaliana* var. Columbia // *Nucl. Acids Res.* – 1990. – **18**. – P. 2888.
40. *Rech E.L., Vianna G.R., Aragao F.J.L.* High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants // *Nature Protocols.* – 2003. – **3**, № 3. – P. 410–418.
41. *Blume Ya.B., Kundelchuk O.P., Solodushko V.G. et al.* Asymmetric somatic hybrids of higher plants resistant to trifluralin // *Proc. Int. Symp. Weed Crop Resist. to Herbicides* (Cordoba, Spain, 1995) / Eds R. De et al. – Univ. Cordoba, 1996. – P. 182–185.
42. *Yemets A.I., Strashnyuk N.M., Blume Ya.B.* Plant mutants and somatic hybrids with resistance to trifluralin // *Cell Biol. Int.* – 1997. – **21**. – P. 912–914.

Поступила 17.07.08